

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ
ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА БЕЛКОМ ТЕПЛОВОГО ШОКА 70 В
ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ ПОСЛЕ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ТИОПЕНТАЛОМ
НАТРИЯ**

Т.А. Кострова¹, К.М. Щепеткова²

¹ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», ул. Бехтерева, д. 1, г. Санкт-Петербург, 192019, Российская Федерация, +7 (812) 365-06-80, e-mail: tasia.pcma.le4@mail.ru.

²ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская набережная, д. 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, Российская Федерация, +7 (812) 328-97-03, e-mail: tesh_07@inbox.ru

Резюме

Длительное глубокое угнетение ЦНС при острых отравлениях нейротоксикантами, развитие дыхательной и циркуляторной форм гипоксии могут стать причиной перехода гипоксии в тканевую (биоэнергетическую) форму, которая может выступить в качестве ведущей причины поражения и гибели нейронов. Применение для фармакологической коррекции БТШ 70 является перспективным в терапии отдаленных последствий острых отравлений нейротоксикантами, так как устраняет выявленный дисбаланс и компенсирует энергетический дефицит клетки.

Ключевые слова: острое отравление, тиопентал натрия, энергетический обмен, лактатдегидрогеназа, креатинкиназа, белки теплового шока.

**EFFICIENCY OF PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF ENERGY EXCHANGE
BY HEAT SHOCK PROTEIN 70 IN A LONG PERIOD AFTER ACUTE POISONING
OF SODIUM TIOPENTAL**

Kostrova T.A.¹, K.M. Shchepetkova²

¹*«Institute of Toxicology» of Federal Medico-Biological Agency of Russia*

²*Federal State budgetary Educational Institution of Higher Education «St. Petersburg State University»*

Summary

Long-term deep depression of the central nervous system in acute poisoning with neurotoxicants, the development of respiratory and circulatory forms of hypoxia can cause the transition of hypoxia to a tissue (bioenergetic) form, which can act as a leading cause of neuronal damage and death. The use of the drug for pharmacological correction HSP 70 is promising in the treatment of long-term consequences of acute poisoning with neurotoxicants, since it eliminated the revealed imbalance and compensated for the energy deficit of the cell.

Key words: acute poisoning, sodium thiopental, energy metabolism, lactate dehydrogenase, creatine kinase, heat shock proteins.

Введение

Одним из основных механизмов повреждения клеток центральной нервной системы является развитие биоэнергетической гипоксии [1, 2, 3]. В основе процесса развития биоэнергетической гипоксии лежат последовательные изменения свойств митохондриальных ферментных комплексов, приводящие к нарушениям энергосинтезирующей функции дыхательной цепи [4, 5, 6]. Возникающий энергодефицит и сопутствующие ему нарушения метаболизма углеводов, белков и липидов способны нарушать функции мембраносвязанных белков, а также изменять структуру протеинлипидного взаимодействия и физико-химические свойства мембран [7, 8, 9]. Это создает предпосылки для инициации перекисного окисления липидов, которое обладает самостоятельным выраженным мембранотоксическим эффектом и замыкает «порочный круг» гипоксического повреждения клетки [10, 11]. Активность ферментов энергетического обмена в тканях головного мозга в отдаленный период после тяжелых отравлений нейротоксикантами может отражать состояние биоэнергетики, играющую первостепенную роль в нормальном функционировании нейронов [12]. Повреждение нервных клеток приводит к нарушению функции митохондрий, дисбалансу энергетических путей, к разрушению клеточных мембран [13]. Поэтому крайне важным представляется вопрос фармакологической коррекции отдаленных последствий острых тяжелых отравлений нейротоксикантами.

Известно, что белки теплового шока (БТШ) участвуют в защите клеток от стресс-индуцируемого апоптоза, стабилизируя клеточные структуры и ингибируя пути его активации. В стрессовых условиях БТШ снижают избыточную стимуляцию стероидными гормонами. Блокада рецепторов этих гормонов уменьшает их апоптотический эффект, из-за чего некоторые клетки при стрессе увеличивают продолжительность жизни. Таким образом, БТШ является своеобразным связующим звеном между ответом на стресс на уровне целостного организма и отдельных клеток [14, 15]. БТШ осуществляют поддержку пространственной структуры белков и доставку их после синтеза в различные отделы клетки, тем самым предохраняя белки от агрегации и денатурации. БТШ предохраняют появление мутаций и обеспечивают условия для восстановления повреждений ДНК, мигрируя в ядро и связываясь с хроматином и ядрышком, а также обладают способностью исправлять неправильно сформировавшиеся белки за счет энергии АТФ [16]. Взаимодействуя с микротрубочками и микрофиламентами, БТШ стабилизируют цитоскелет, тем самым увеличивая устойчивость клетки к механическому повреждению, денатурации и агрегации белков клетки [17, 18, 19].

Целью экспериментального исследования явилось оценка влияния фармакологической коррекции белком теплового шока 70 на активность ферментов энергетического обмена в тканях головного мозга крыс через 1 и 3 месяца после острого отравления тиопенталом натрия.

Материалы и методы

Исследование проведено на белых беспородных крысах-самцах массой 180-220 г, полученных из питомника РАН «Рапполово». Длительность акклиматизационного периода для животных составляла 14 дней. Животные содержались в соответствии с требованиями ГОСТ 33044-2014 от 01.08.2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Крысы были разделены на три группы – контрольную и две опытных. Животным из первой опытной группы вводили тиопентал натрия внутривенно однократно в дозе 85 мг/кг массы животного. Животным из второй опытной группы на следующий день после введения тиопентала натрия проводили фармакологическую коррекцию белком теплового шока 70 (БТШ 70) интраназально в дозе 50 мкг/кг 1 раз в 2 дня в течение двух недель (рекомендация ИМБ РАН) [20]. Животным контрольной группы был введен интраназально физиологический раствор. Количество животных в каждой группе составляло по 6 особей.

Через 1 и 3 месяца после введения токсиканта животные были подвергнуты эвтаназии. Извлеченный после декапитации головной мозг отмывали холодным физиологическим раствором от крови в течение 35-50 с и замораживали в морозильной камере при -70 °C.

Перед исследованием ткани головного мозга лабораторных животных извлекали из морозильной камеры, взвешивали, измельчали и гомогенизировали POLYTRON PT-1200E (Швейцария) с механическим гомогенизатором при 3000 об./мин, добавляя охлажденный до температуры 0°C 0,1 М калий-фосфатный буфер с pH 7,4 в соотношении ткань:буфер – 1:9. Полученный гомогенат использовали для определения активности лактатдегидрогеназы и креатинкиназы на биохимическом анализаторе «А-25». Для определения активности ферментов энергетического обмена использовались наборы фирмы BioSystems S.A. (Испания). Расчет активности ферментов производили на грамм белка, концентрацию которого также определяли на биохимическом анализаторе «А-25» с использованием наборов фирмы BioSystems S.A. (Испания). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6.0. Для представления данных использовали среднее значение и ошибку среднего ($m \pm sem$). Для оценки достоверности различий между исследуемыми характеристиками

экспериментальных групп использовался U-критерий Манна-Уитни с уровнем значимости равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Через 1 месяц после острого отравления тиопенталом натрия при исследовании ферментов энергетического обмена было выявлено достоверное увеличение активности креатинкиназы на 13,1% и лактатдегидрогеназы на 13,0% в группе крыс, не получавших фармакологическую коррекцию в сравнении с контрольной группой (Таблица 1).

Таблица 1

Изменение активности ферментов энергетического обмена в гомогенате тканей головного мозга крыс через 1 месяц после острого отравления тиопенталом натрия и проведенной фармакологической коррекции

Исследуемые показатели (M±m)	Экспериментальные группы		
	Контроль (N=6)	Без коррекции (N=6)	БТШ 70 (N=6)
Креатинкиназа, Ед. акт./г белка	273,3±8,1	309,2±7,4*	267,0±11,7#
ЛДГ, Ед. акт./г белка	25,4±0,9	28,7±0,9*	23,3±2,2#
* – достоверно в сравнении с контрольной группой (при $p \leq 0,05$; критерий Манна-Уитни) # – достоверно в сравнении с группой без фармкоррекции (при $p \leq 0,05$; критерий Манна-Уитни)			

Изучение активности ферментов энергетического обмена после применения БТШ 70 показало снижение активности креатинкиназы на 13,6% ($p < 0,05$) и лактатдегидрогеназы на 18,8% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс без фармкоррекции. В сравнении с контрольной группой в данной группе достоверных изменений выявлено не было.

Проведенное исследование показало увеличение активности ферментов энергетического обмена через 1 месяц после острого отравления нейротоксикантом, что может свидетельствовать об активации процессов гликолиза из-за снижения выработки АТФ в митохондриях. Применение препаратов фармакологической коррекции стимулировало аэробные окислительные процессы, о чем свидетельствует восстановление активности исследуемых ферментов энергетического обмена до уровня контрольной группы.

Через 3 месяца после острого отравления тиопенталом натрия при исследовании ферментов энергетического обмена также было выявлено достоверное увеличение активности креатинкиназы на 9,3% и лактатдегидрогеназы на 23,1% в группе крыс, не получавших фармакологическую коррекцию в сравнении с контрольной группой (Таблица 2).

Применение БТШ 70 приводило к снижению активности креатинкиназы на 7,0% ($p < 0,05$) и лактатдегидрогеназы на 10,3% ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс без фармакоррекции. В сравнении с контрольной группой в данной группе достоверных изменений выявлено не было.

В результате проведенного исследования через 3 месяца после острого отравления нейротоксикантом наблюдалась менее выраженная активация ферментов энергетического обмена, отвечающих за гликолитический и алактатный механизм энергообеспечения.

Таблица 2

Изменение активности ферментов энергетического обмена в гомогенате тканей головного мозга крыс через 3 месяца после острого отравления тиопенталом натрия и проведенной фармакологической коррекции

Исследуемые показатели (М±m)	Экспериментальные группы		
	Контроль (N=6)	Без коррекции (N=6)	БТШ 70 (N=6)
Креатинкиназа, Ед. акт./г белка	367,7±9,6	402,1±6,3*	373,9±7,9#
ЛДГ, Ед. акт./г белка	24,4±1,2	30,0±1,5*	26,9±2,2
* – достоверно в сравнении с контрольной группой (при $p \leq 0,05$; критерий Манна-Уитни)			
# – достоверно в сравнении с группой без фармакоррекции (при $p \leq 0,05$; критерий Манна-Уитни)			

Заключение

Полученные данные подтверждают активацию анаэробного окисления глюкозы в отдаленный период после отравления нейротоксикантом и соотносятся с данными исследования углеводного обмена при воздействии других неблагоприятных факторов на нервные клетки головного мозга [21, 22]. Применение фармакологической коррекции БТШ 70 позволило устранить выявленный дисбаланс и компенсировать выявленные нарушения. В связи с этим БТШ 70 представляет несомненный интерес как перспективное фармакологическое средство, предназначенное, для лечения гипоэнергетических состояний, в т. ч. при нейроинтоксикациях.

Список литературы.

1. Кашуро В.А., Долго-Сабуров В.Б., Дагаев С.Г. и др. Изучение роли антиоксидантной системы и перекисного окисления липидов в патогенезе тиопенталовой комы // Химическая и биологическая безопасность. 2012. №5. С. 3–7.
2. Батоцыренова Е.Г. Влияние эндогенных и экзогенных модификаторов на активность Na^+, K^+ -АТФазы. Автореф. дис. канд. биол. наук. 2005. 23 с.
3. Зарубина И. В. Современные представления о патогенезе гипоксии и ее фармакологической коррекции // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2011. Т. 9. №3. С. 31-48.
4. Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция / Материалы 5 Российской конференции с международным участием. М., 2008. 128 с.
5. Батоцыренова Е.Г., Кострова Т.А., Щепеткова К.М. и др. Оценка отдаленных последствий острых тяжелых отравлений нейротоксикантами // Медицина: теория и практика. 2019. Т. 4. №5. С. 81-82.
6. Гомазков О. А. Нейрохимия ишемических и возрастных патологий мозга. М., 2003. 323 с.
7. Кострова Т.А., Батоцыренова Е.Г., Кашуро В.А. и др. Оценка биохимических показателей в тканях головного мозга у крыс в отдалённый период после тяжёлого отравления тиопенталом натрия // Медицина экстремальных ситуаций. 2019. Т. 21. №3. С. 429-435.
8. Зенков Н.К., Лапкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты. М. Интерпериодика: 2001. 343 с.
9. Лапкин В.З., Тихадзе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях. М., 2001. 78 с.
10. Батоцыренова Е.Г., Бакулев С.Е., Невзорова Т.Г. и др. Изменение ритмов биохимических показателей при моделировании острого десинхроноза // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2020. Т. 170. №8. С. 155-159.
11. Зозуля Ю. А., Барабой В. А., Сутковой Д. А. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная защита при патологии головного мозга. М.: Знание-М, 2000. 344 с.
12. Батоцыренова Е.Г., Кашуро В.А., Иванов М.Б. Маркеры энергетического обмена в условиях нарушения циркадианных ритмов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2017. Т. 20. №11. С. 39-42.
13. Батоцыренова Е.Г., Краснов К.А., Кострова Т.А. и др. Фармакотерапия нарушений энергетического обмена и антиоксидантной системы при десинхронозе // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2018. Т. 81. №5. С. 25.

14. Максимович Н.Е., Бонь Е.И. Белки теплового шока. Свойства. Роль в адаптации. Методические подходы к определению // Биомедицина. 2020. Т. 16(2). С. 60-67.
15. Понасенко О.А., Ганковская Л.В., Свитич О.А. Роль белка теплового шока 70 в патогенезе сердечно-сосудистой патологии // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21(2). С. 201-208.
16. Белан Д.В., Екимова И.В. Белки теплового шока при конформационных болезнях мозга // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2019. Т. 105. №12. С. 1465-1485.
17. Min H.J., Choe J.W., Chang M.Y. et al. The expression and correlation of Hsp 70 and Hsp 27 in serous middle ear effusion fluids of pediatric patients – a preliminary study // Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 2017. Vol. 101. P. 145-149.
18. Hilf N., Singh-Jasuja H., Schild H. The heat shock protein gp96 links innate and specific immunity // Int. J. Hyperthermia. 2002. Vol. 18. P. 521-533.
19. Levey D.L., Brander C., Srivastava P.K. The potential of heat shock protein-peptide complexes as a therapeutic vaccine // J. HIV Ther. 2005. Vol. 10. P. 56-59.
20. Ивницкий Ю.Ю., Краснов К.А., Иванов М.Б., Рейнюк В.Л., Головкин А.И. Перспективы назального спрея в арсенале средств первой помощи при острых отравлениях // Токсикологический вестник. 2020. №2(161). С. 4-10.
21. Кострова Т.А., Лисицкий Д.С., Батоцыренова Е.Г. и др. Исследование сочетанного действия тиопентала натрия и нарушения циркадианных ритмов на поведенческие реакции лабораторных животных // Medline. ru. 2018. Т. 19. №1. С. 167-181.
22. Батоцыренова Е.Г., Кашуро В.А., Иванов М.Б. и др. Изменение показателей энергетического обмена в условиях десинхроноза // Acta Naturae. 2016. №S1. С. 182.

References.

1. Kashuro V.A., Dolgo-Saburov V.B., Dagaev S.G. et al. Study of the role of the antioxidant system and lipid peroxidation in the pathogenesis of thiopental coma // Chemical and Biological Safety. 2012. №S. P. 3–7. [in Russia]
2. Batotsyrenova E.G. Influence of endogenous and exogenous modifiers on the activity of Na^+, K^+ - ATPase. Author's abstract. dis. cand. biol. sciences. 2005. 23 p. [in Russia]
3. Zarubina IV Modern ideas about the pathogenesis of hypoxia and its pharmacological correction // Reviews on clinical pharmacology and drug therapy. 2011. Vol. 9. №3. P. 31-48. [in Russia]
4. Hypoxia: mechanisms, adaptation, correction / Materials of the 5th Russian conference with international participation. M., 2008. 128 p. [in Russia]

5. Batotsyrenova E.G., Kostrova T.A., Schepetkova K.M. Evaluation of the remote consequences of acute severe poisoning with neurotoxicants // *Medicine: theory and practice*. 2019. Vol. 4. №S. С. 81-82. [in Russia]
6. Gomazkov OA *Neurochemistry of ischemic and age-related brain pathologies*. М., 2003. 323 p. [in Russia]
7. Kostrova T.A., Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A. et al. Assessment of biochemical parameters in brain tissues of rats in the long-term period after severe poisoning with sodium thiopental // *Medicine of extreme situations*. 2019. Vol. 21. №3. P. 429-435. [in Russia]
8. Zenkov N.K., Lapkin V.Z., Menshchikova E.B. Oxidative stress. Biochemical and pathophysiological aspects. М. Interperiodica: 2001. 343 p. [in Russia]
9. Lapkin V.Z., Tikhadze A.K., Belenkov Yu.N. Free radical processes in normal and pathological conditions. М., 2001. 78 p. [in Russia]
10. Batotsyrenova E.G., Bakulev S.E., Nevzorova T.G. et al. Changes in the rhythms of biochemical parameters in the modeling of acute desynchronosis // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2020. Vol. 170. №8. P. 155-159. [in Russia]
11. Zozulya Yu. A., Baraboy VA, Sutkova DA Free radical oxidation and antioxidant protection in brain pathology. М.: Knowledge-M, 2000. 344 p. [in Russia]
12. Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A., Ivanov M.B. Markers of energy metabolism in conditions of disturbance of circadian rhythms // *Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2017. Vol. 20. №11. P. 39-42. [in Russia]
13. Batotsyrenova E.G., Krasnov K.A., Kostrova T.A. and other Pharmacotherapy of disorders of energy metabolism and antioxidant system in desynchronosis // *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2018. Vol. 81. №S. P. 25. [in Russia]
14. Maksimovich N.E., Bon E.I. Heat shock proteins. Properties. Role in adaptation. Methodological approaches to the definition // *Biomedicine*. 2020. Vol. 16(2). P. 60-67. [in Russia]
15. Ponasenko O.A., Gankovskaya L.V., Svitich O.A. The role of heat shock protein 70 in the pathogenesis of cardiovascular pathology // *Medical Immunology*. 2019. Vol. 21(2). P. 201-208. [in Russia]
16. Belan D.V., Ekimova I.V. Heat shock proteins in conformational brain diseases // *Russian Physiological Journal name of I.M. Sechenov*. 2019. Vol. 105. №12. P. 1465-1485. [in Russia]
17. Min H.J., Choe J.W., Chang M.Y. et al. The expression and correlation of Hsp 70 and Hsp 27 in serous middle ear effusion fluids of pediatric patients – a preliminary study // *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*. 2017. Vol. 101. P. 145-149.

18. Hilf N., Singh-Jasuja H., Schild H. The heat shock protein gp96 links innate and specific immunity // Int. J. Hyperthermia. 2002. Vol. 18. P. 521-533.
19. Levey D.L., Brander C., Srivastava P.K. The potential of heat shock protein-peptide complexes as a therapeutic vaccine // J. HIV Ther. 2005. Vol. 10. P. 56-59.
20. Ivnitsky Yu.Yu., Krasnov K.A., Ivanov M.B., Reynyuk V.L., Golovko A.I. Prospects for a nasal spray in the arsenal of first aid for acute poisoning // Toxicological Bulletin. 2020. №2(161). P. 4-10. [in Russia]
21. Kostrova T.A., Lisitsky D.S., Batotsyrenova E.G. et al. Investigation of the combined effect of sodium thiopental and disturbances in circadian rhythms on behavioral responses of laboratory animals // Medline. ru. 2018. Vol. 19. №1. P. 167-181. [in Russia]
22. Batotsyrenova E.G., Kashuro V.A., Ivanov M.B. and other Changes in indicators of energy metabolism in conditions of desynchronosis // Acta Naturae. 2016. №S1. P. 182. [in Russia]